Steroidhormone beim Meerschweinchen

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Giselher Braunberger

Saarbrücken

1969

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität des Saarlandes, Homburg / Saar
Direktor: Professor Dr.med., Dr.phil., Dipl.-
Chem. W. Z i m m e r m a n n

Steroidhormone beim Meerscheinchen

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der Doktorwürde der

Hohen Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

vorgelegt von
Giselher Braunberger

August 1969

Dekan: Professor Dr. G. Dhom
Referent: Professor Dr. G.W. Oertel
Promotionsdatum: 24. 11. 1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG Seite 1

B. METHODE Seite 12

I. Tierexperimenteller Teil

II. Chemische Aufarbeitung

C. ERGEBNISSE Seite 17

D. DISKUSSION Seite 20

E. ZUSAMMENFASSUNG Seite 26

F. LITERATURVERZEICHNIS

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41542722_0022

A. EINLEITUNG

Der Versuch, Untersuchungsergebnisse aus dem Tierreich auf den menschlichen Organismus zu übertragen, fand schon frühzeitig Eingang in die Medizin.
Naturgemäß waren vergleichend- anatomische Untersuchungen das erste Glied in einer hier nur auszugsweise zu beschreibenden Kette:
Als eines der bekanntesten Beispiele ist hier der Bericht von Galen zu nennen, der anatomische Untersuchungen an der Schweineleber anstellte. Demzufolge war man bis in das Mittelalter hinein in Fachkreisen der Meinung, auch die menschliche Leber besitze fünf Leberlappen.
Ein weiteres sehr bekanntes Beispiel ist uns im Zusammenhang mit der Entdeckung des Blutkreislaufes bekannt: Harvey, ein englischer Arzt, stellte seine ersten Untersuchungen über den Blutkreislauf der Hühner an, Ergebnisse, die später auf den Menschen übertragen werden konnten.
In den späteren Jahren nahm die Erkenntnissuche in der Medizin immer mehr wissenschaftlichen Charakter an. Gleichzeitig mit ihr fand auch das Tierexperiment breiteren Eingang in die medizinischen Untersuchungsmethoden.

So seien auch hier die Ergebnisse der Versuche erwähnt, die der russische Arzt Pawlow an seinen Hunden anstellte. Sie ließen sich zum größten Teil auf den Menschen übertragen und bilden mit die Grundlage der Gewebstransplantation. Ebenfalls soll hier noch auf den Rh-Faktor hingewiesen werden, eine Abkürzung für eine Blutgruppeneigenschaft, die zuerst beim Rhesusaffen nachgewiesen wurde und in der Blutgruppenserologie heute ein wesentlicher Faktor hinsichtlich Transfusion und Fragen in der Geburtshilfe und Vaterschaft ist.

In der Folgezeit erfuhr die Medizin eine immer weitergehende Differenzierung ihrer Fachgebiete und Untersuchungsmethoden. Damit waren auch dem Tierexperiment zwei grundlegende Anwendungsgebiete vorgezeichnet.

Zuerst seien die vergleichenden Untersuchungen erwähnt, wie sie etwa in der Embryologie, der funktionellen Anatomie, Histologie, Physiologie usw. benutzt wurden. Dieses Anwendungsprinzip hat auch heute noch seine volle Gültigkeit in der Grundlagenforschung. Aus der Erkenntnis physiologischer und pathophysiologischer Zusammenhänge ergab sich sehr bald die Möglichkeit, das Tierexperiment zu diagnostischen Hilfeleistungen heranzuziehen. So leistet z. B. das Meerschweinchen bei der Diagnostik der Tuberkulose im Tierversuch auch heute noch wertvolle Dienste. Weit verbreitet ist auch der Einsatz verschiedener Tierspezies zum Nachweis biologischer Aktivitäten verschiedener hormoneller Substanzen, wie dies etwa für den Mausuterustest auf gonadotrope Substanzen zutrifft. (1)

Des weiteren nahm der biologische Test zum Nachweis des Choriongonadotropins in der Schwangerschaft lange Zeit eine bedeutende Stellung in der gynäkologisch/geburtshilflichen Diagnostik ein.

Die Gewinnung verschiedener Seren oder z. B. die Gewinnung artfremden Insulins stellen weitere Beispiele für die Bereicherung der Humanmedizin durch das Tierreich dar.

Außerdem sind differenzierte biologische Nachweismethoden für FSH und LH bekannt, die ebenso wie der quantitative Nachweis von ACTH an hypophysektomierten Ratten Beispiele für die breite Anwendungsmöglichkeit des Tierversuchs darstellen. Letzterer leistet auch wertvolle Dienste in der Pharmakologie, wie etwa an der Histaminempfindlichkeit des Meerschweinchendarms gezeigt oder auf dem Gebiet der Muskelphysiologie und ihrer Beeinflußbarkeit durch verschiedene Pharmaka.

Ganz besonders wichtig aber und nahezu unersetzlich ist der Tierversuch zur Beurteilung der Toxizität verschiedener Pharmaka, bezw. Festlegung von Toleranzgrenzen.

Schließlich bedient sich die Carcinomforschung des Tierexperimentes, man denke nur an die Züchtung experimenteller Tumoren, insbesondere bei Mäusen.

Entsprechend den Anforderungen, die man an die Aussagekraft einzelner Experimente stellt, begrenzt sich der Einsatz von Tieren auf verschiedene besonders geeignete Spezies. Setzt man bei der Gewinnung von Seren hauptsächlich Großtiere ein, so hat sich für den Einsatz in anderen Bereichen die Verwendung von Kleintieren bewährt.

Neben der ausgezeichneten Möglichkeit, reinerbige Stämme bei Kleintieren zu züchten, waren bei dem Einsatz dieser Tiere letztlich auch Probleme der Haltung und Unterbringung mit ausschlaggebend. Die Verwendung reinerbiger Stämme erweist sich als wesentliche Erleichterung in der Beurteilung tierexperimenteller Ergebnisse.

Mit der Benutzung statistischer Auswertverfahren zeigte sich beim Einsatz der genannten reinerbigen Tiere eine geringere Streubreite im biologischen Verhalten gegenüber Mischkollektiven mit verschiedenen Artvarianten.

Letztlich läßt sich dadurch die Menge der eingesetzten Tiere, die für eine statistisch belegte Aussage nötig sind, auf ein geringeres Maß beschränken. Neben dieser mehr mathematischen Betrachtungsweise ergaben sich weitere Probleme bei Verwendung von Tieren, wichtig vor allem für die sog. Grundlagenforschung, bei der es auf eine gute Vergleichbarkeit der Tierexperimente mit den menschlichen Bedingungen ankommt. Zu erachten sind hier Unterschiede in der Verträglichkeit verschiedener Pharmaka oder auch Unterschiede im Metabolismus der zu vergleichenden Organismen. So läßt sich z. B. die quantitative Bestimmung von ACTH als ein endokrinologisches Teilproblem durch den Einsatz von hypophysektomierten Ratten mit relativ großer Genauigkeit lösen. (50)

Für vergleichende Untersuchungen hinsichtlich des Steroidmetabolismus dagegen erscheint die Ratte wenig geeignet. Kaninchen, Ratte und Maus produzieren im Gegensatz zum Menschen, bei dem der Hauptvertreter der Corticosteroide das Cortisol ist, vorwiegend Corticosteron. Aber auch hinsichtlich der

Ausscheidung verschiedener Steroide im Urin ergeben sich hierbei bedeutende Unterschiede gegenüber den menschlichen Verhältnissen. Im Gegensatz zu den vorgenannten Tieren bietet sich das Meerschweinchen, das ebenso wie der Mensch vorwiegend Cortisol als Hauptvertreter der Corticosteroide produziert, zu vergleichenden Untersuchungen an. Aber auch hier bestehen grundlegende Unterschiede zum Steroidmetabolismus beim Menschen, wie später noch gezeigt werden soll. Unbeschadet der letztgenannten Tatsache lassen sich bei der Untersuchung des Steroidhaushaltes des Meerschweinchens wertvolle Analogieschlüsse zu den Verhältnissen beim Menschen ziehen. Nicht zuletzt wird der Einsatz des Meerschweinchens begünstigt durch das Vorhandensein ausgezeichneter reinerbiger Stämme, die Einfachkeit der Haltung, die durch die Verwendung spezieller Futtermittel erleichtert wird. (18, 19)

Im Folgenden soll nun eine Übersicht der Normalwerte von Steroidhormonen im Urin und Plasma wiedergegeben werden. An dieser Stelle seien noch einige prinzipielle Überlegungen zur Beurteilung von Harn- und Plasmaanalysen angeführt, wobei das Gesagte nicht nur für das Tierexperiment, sondern allgemein auch für die Humanmedizin gilt. Hinsichtlich der Aussagekraft von Steroidbestimmungen im Harn eröffnen sich 2 Möglichkeiten:

1. die herkömmlichen Untersuchungsmethoden, bei denen Steroidgruppen analysiert werden,
2. die Erfassung bestimmter Steroide durch die fraktionierte Aufarbeitung von Harnextrakten, die eine differenzierte Aussage hinsichtlich des Stoffwechselspektrums zulassen.

Bei beiden Verfahren muß jedoch berücksichtigt werden, daß es sich bei den erfaßten Steroiden lediglich um Endstufen und Abbauprodukte stoffwechselaktiver Steroidhormone handelt. Demzufolge lassen nur extreme Abweichungen von ermittelten Normalwerten Rückschlüsse auf eine evtl. Über- oder Unterproduktion zu. Die Bestimmung der Harnsteroide hat deshalb nur eine begrenzte Aussagekraft. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß eine starke Verunreinigung des zu untersuchenden Urins den Untersucher vor schwierige Aufgaben stellt. So können einerseits bestimmte im Harn enthaltene Stoffe die Ergebnisse der einzelnen Farbreaktionen verfälschen, zum anderen kann eine bakterielle Verunreinigung die zu untersuchenden Steroide direkt weiter metabolisieren.
Die Notwendigkeit, weitere Reinigungsschritte in das Analysenverfahren einzubauen, stellt durch methodische Verluste die Vergleichbarkeit derartiger Untersuchungen oft in Frage. (13)

Anders liegen dagegen die Probleme bei Plasmauntersuchungen von Steroiden, hierbei werden größtenteils Substanzen nachgewiesen, die der tatsächlichen Wirkform der Hormone entsprechen, wenn auch hier Transportformen eine besondere Rolle spielen können. Dies trifft insbesondere für die Bindung von Hormonen an Plasmaeiweißkörper zu, desgleichen für bestimmte Konjugate. In diesem Zusammenhang sei auf die von Gertel beschriebenen lipophilen Steroidkonjugate hingewiesen, deren biologische Bedeutung noch nicht als geklärt angesehen werden kann.

Zusammenfassend betrachtet stellen die Untersuchungen von Steroiden in Urin und Plasma, - insbesondere, wenn sie gleichzeitig durchgeführt werden, - eine wertvolle Bereicherung in der klinischen Diagnostik dar. Morphologische Untersuchungen an der NNR helfen hier nicht weiter. (9)

Beim Meerschweinchen - es wurden verschiedene Stämme untersucht, vorwiegend jedoch männliche Tiere vom Stamm Pirbright white und vom Stamm des St. serum institute in Kopenhagen - konnten die in Tabelle 1 wiedergegebenen Normalwerte für bestimmte Steroidgruppen herausgearbeitet werden. (49, 22, 31, 54, 52, 53)

Plasma (µg/ 100 ml)	frei	gebunden
Corticosteroide	15 - 24	40 - 52
17-Ketosteroide	5,3	50 - 67
Harn (mg/ 24 Std.)		
Corticosteroide		0,2 - 0,4
17-Ketosteroide		0,2 - 0,4

Tabelle 1 Normalwerte von Steroidhormonen im Plasma und Urin des Meerschweinchens.

Folgende Untersuchungsmethoden kamen dabei zur Anwendung:

Die Bestimmung der Corticosteroide im Plasma wurde nach der Methode von Porter und Silber (46) durchgeführt, die der 17-Ketosteroide im Plasma nach der Methode von Oertel und Kaiser. (45)

Die Werte der 17-Ketosteroide im Urin wurden nach der von Zimmermann (64) beschriebenen Methode ermittelt, die der 17-ketogenen Steroide im Harn nach der Methode von Norymberski (33) und Mitarbeitern.
Es handelt sich dabei um Werte, die unter streng konstanten Versuchsbedingungen und über längeren Zeitraum gleichbleibender Fütterung erhalten wurden.
Zur technischen Durchführung dieser Untersuchungen ist zu bemerken, daß der Urin im allgemeinen eine stärkere Verschmutzung durch Kotbeimengungen aufwies und daß die Gewinnung des Blutes durch Dekapitation erfolgte.
Eine durch Stressgeschehen bedingte Änderung der Plasmasteroide läßt sich jedoch ausschließen, da die Dekapitation unmittelbar nach Tötung durch Genickschlag erfolgte.

Die in Abb. 1 wiedergegebenen Werte beziehen sich ausschließlich auf Meerschweinchen mit einem Körpergewicht zwischen 250 und 350 Gramm.
Bei Tieren mit einem größeren oder kleineren Körpergewicht sind Abweichungen von diesen Werten zu erwarten.
Abbildung 1 zeigt ein derartiges Beispiel, wiedergegeben sind die Plasmaspiegel der 17-Hydroxycorticosteroide beim Meerschweinchen mit einem Gewicht zwischen 200 und 1000 Gramm.
Die ausgezogenen Linien entsprechen einer schematischen Wiedergabe der Zwei-Sigmawerte. Man erkennt eine deutliche Abnahme der Plasmaspiegel mit zunehmendem Körpergewicht. (51)

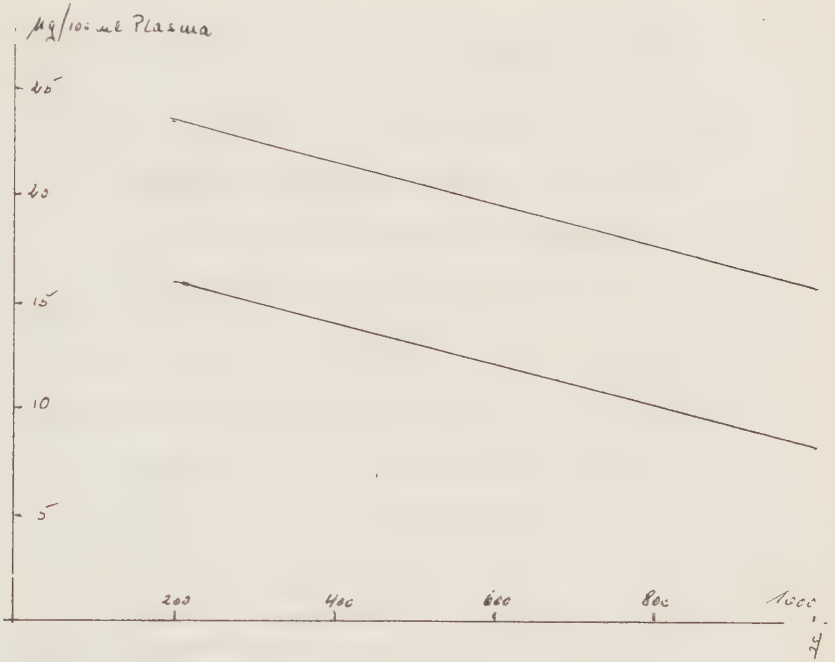

Abb. 1 Plasmaspiegel der 17-OHCS in Relation zum Körpergewicht beim Mb.

Wie umseitig bereits erwähnt, lassen sich bei diesen Werten auch nach gemeinsamer Betrachtung von Harn- und Plasmasteroiden nur bedingte Rückschlüsse auf die Dynamik des Stoffwechselgeschehens von Steroidhormonen ziehen.
Zur Beurteilung der Dynamik des Stoffwechsels bedient man sich vornehmlich zweier Untersuchungsmethoden: der Bestimmung der Sekretionsrate und der biologischen Halbwertszeit. (34)
Die Sekretionsrate läßt sich aus der spezifischen Aktivität des injizierten Steroids sowie aus der Menge und spezifischen Aktivität eines im Urin vorkommenden Metaboliten errechnen. Diese Untersuchungsmethode stößt beim Meerschweinchen auf Schwierigkeiten, da man aus dem gesammelten Urin den

gewünschten Metaboliten wegen starken Verunreinigungen nur schwer und unter großen Verlusten exakt darstellen kann. Bei ausreichend hoher spezifischer Aktivität läßt sich hingegen die biologische Halbwertszeit von Steroiden relativ einfach festlegen. In Tabelle 2 sind die von Reinand et al. (59, 60) ermittelten biologischen Halbwertszeiten einiger Steroide aufgeführt:

Cortisol	17,0 Min.
Pregnenolon	4,4 Min.
17-OH-Pregnenolon	2,0 Min.
Progesteron	3,3 Min.
freies DHEA	7,5 - 8,0 Min.
DHEA-Sulfatid	23,0 - 26,0 Min.
DHEA-Sulfat	2,5 - 3,0 Min.

Tabelle 2

Biologische Halbwertszeiten von Steroiden beim Meerschweinchen.

Unter Berücksichtigung der Plasmaspiegel ist an Hand der biologischen halbwertszeiten ein Hinweis auf die Höhe der Sekretionsrate möglich. So ergibt sich eine tägliche Bildung von Cortisol von 0,5 - 1,0 mg. Verglichen mit der Ausscheidung im 24-Stunden-Harn an 17-ketogenen Steroiden erscheint dieser Wert zwar sehr hoch, doch wird er untermauert durch die Tatsache, daß allein 0,3 - 0,5 mg Cortisol durch Umwandlung im Blut verbraucht werden. (56)

Auch Dehydroepiandrosteron unterliegt zu einem beträchtlichen Teil einem Metabolismus im Blut. (47) In diesem Fall stößt eine Berechnung der Sekretionsrate aus Halbwertszeit und Plasmaspiegel auf große Schwierigkeiten.
Nach Oertel liegt Dehydroepiandrosteron im Plasma hauptsächlich in Form eines lipophilen Sulfokonjugats oder Steroidsulfatids vor, das bei der Aufarbeitung sehr leicht in Steroidsulfat zerfällt. (41, 42, 35, 39) Sulfat und Sulfatid aber unterscheiden sich ganz wesentlich in ihrer biologischen Halbwertszeit. Nähme man ausschließliches Vorliegen von Deydroepiandrosteron als Sulfat an, so käme man auf eine Tagesproduktion von nahezu 10 mg. Im Falle eines ausschließlichen Vorliegens als Sulfatid erhielte man den wesentlich wahrscheinlicheren Wert von 1 mg. Es ist daher die Annahme naheliegend, daß Dehydroepiandrosteron im wesentlichen in der Sulfatidform vorliegt, und zwar in größerem Maße, als dies im Verlauf der analytischen Verfahren in Erscheinung tritt.
Aus den bisher beschriebenen Untersuchungsmethoden des Nachweises von Steroiden in Harn und Plasma, der Bestimmung der biologischen Halbwertszeit, lassen sich bereits wertvolle Rückschlüsse auf die Sekretion einzelner Steroide bzw. Steroidgruppen ziehen.
Eine weitere Möglichkeit, dieses Problem einer Lösung zuzuführen, stellt die Bestimmung von Steroiden im Nebennierenvenenblut dar. (40) Im folgenden soll nun über Untersuchungen an Meerschweinchen berichtet werden, bei denen Nebennierenvenenblut und gleichzeitig gewonnenes peripheres Blut auf den Gehalt an verschiedenen Steroiden untersucht wurde.

B. Methode:

I. Tierexperimenteller Teil:

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden erbreine männliche Meerschweinchen vom Stamm Pirbright white mit einem Gewicht von 300 Gramm verwendet. Die Tiere - insgesamt 20 - wurden 3 Wochen vor Versuchsbeginn unter konstanten Bedingungen gehalten. Die Fütterung bestand aus Altromin MS und Wasser ad libitum. Zur Narkose erhielten die Tiere 0,2 mg Nembutal pro 100 Gramm Körpergewicht. Nach Eröffnung des Abdomens wurde der Gefäßstiel der linken Niere freipräpariert, danach ließen sich Arteria und Vena renalis im Nierenbecken abklemmen. Durch Unterbinden sämtlicher venöser Zuflüsse, insbesondere der Vena spermatica, konnte nach Ligatur der Nierenvene hinter der Einmündung der Vena suprarenalis ein gut punktierbares Gefäßstück geschaffen werden, um Nebennierenvenenblut zu gewinnen. Zur Kontrolle wurde gleichzeitig peripheres Venenblut aus der Vena cava inf. entnommen. Die Versuchsdauer betrug für jedes Einzeltier nach Punktieren des derart geschaffenen Gefäßstückes maximal 3 Minuten. Während dieser Zeit wurde etwa die zehnfache Menge peripheren Blutes gewonnen. Das nach Heparinisieren und Zentrifugieren bei 3000 Umdrehungen/Min. gewonnene Plasma sämtlicher Versuchstiere wurde gepoolt.

II. Chemische Aufarbeitung:

Die chemische Aufarbeitung des derart gewonnenen Plasmas erfolgte nach bekannten und bewährten Methoden: (45, 46, 20, 38)

a) Extraktion der freien Steroide:

Der Plasmapool des Nebennierenvenenblutes wurde auf die doppelte Menge mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, anschließend erfolgte die Extraktion der freien Steroide mittels 3 Volumina eiskalten Methylenchlorids, wobei erst gründlich geschüttelt und danach kurz zentrifugiert wurde. Das Methylenchlorid wurde abgesaugt und die Extraktion zweimal wiederholt. Die vereinigten Methylenchloridphasen wurden anschließend mit etwa 10 ml eiskalter 0,1 N Natronlauge, anschließend zweimal mit Aqua bidest. gewaschen. Das derartig gereinigte Methylenchlorid wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und bei 35° C im Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde in 70% Methanol gelöst und bei -18° C in der Tiefkühltruhe gehalten. Damit ließ sich nach Zentrifugieren und Filtrieren in der Tiefkühltruhe ein Großteil der im Methylenchlorid gelösten Lipoide entfernen. Nach Zusatz von Methanol/Äther (1 : 3 v/v) konnte das Filtrat im Rotationsverdampfer erneut zur Trockne gebracht werden.

b) Extraktion und Reinigung der Gesamtkonjugate:

Nach der Extraktion der freien Steroide wurde die Plasmaphase mit 5 Volumen Aceton/Äthanol (1 : 1 v/v) versetzt und 30 Minuten bei 37° C geschüttelt. Nach mehrstündigem Stehenlassen ließ sich das ausgefällte Eiweiß abfiltrieren, sodann spülte man den Eiweißrückstand mit Äthanol/Aceton (1 : 4 v/v) nach. Der Extrakt wurde dann bei 37° C im Rotationsverdampfer bis auf 2 ml

Eiweißkörpern wurden diese 2 ml mit etwa 10 ml Methanol/Chloroform (1 : 1 v/v) aufgenommen, etwa 1 - 2 Stunden stehengelassen und anschließend filtriert. Nach erneutem Eindampfen bis fast zur Trockne wurde der Rückstand in etwa 2 - 3 ml Chloroform/Methanol (1 : 9 v/v) aufgenommen und auf eine Säule aus DEAE Sephadex A 25 (Pharmacia, Upsala, Schweden (36)) gebracht.

c) Ionenaustausch-Chromatographie zur Trennung von Steroidkonjugaten:

Das DEAE Sephadex A 25 wurde im Wechsel 45 Minuten mit 0,5 N Salzsäure und 0,5 N Natronlauge behandelt, anschließend mit Aqua dest. bis zur neutralen Reaktion gewaschen. Mit 90% Methanol und Chloroform/Methanol/Wasser (1 : 9 : 2 v/v) wurde zur Vorbehandlung weiter gewaschen. Nach Aufbringung des Extraktes auf die Säule wurden mit nachstehenden Lösungsmitteln die einzelnen Konjugate eluiert:

1. Chloroform/Methanol/Wasser (1 : 9 : 2 v/v)
2. Methanol/Wasser (8 : 2 v/v)
3. Wasser
4. 1 M Ammonium-Sulfat + 0,1 Vol. % 1 N Schwefelsäure

In den ersten beiden Fraktionen befinden sich zusammen mit den lipophilen solvolysierbaren Steroidsulfatiden auch die Steroidglucuronoside, im 4. Eluat nach Versuchen von Oertel und Kaiser lediglich Steroidsulfate. (44)

Im Rotationsverdampfer wurden die ersten beiden Fraktionen bei 35° C zur Trockne gebracht und die mit Äthylacetat extrahierten Steroidsulfate wurden der Solvolyse zugeführt.

d) Die Trennung der Sulfatide und Glucuronoside ließ sich mittels Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G (Merck, Darmstadt) im Lösungsmittelsystem Methanol/ Chloroform/Ammoniak (20 : 5 : 0,2 v/v) vornehmen. Im Verlauf dieser Dünnschichtchromatographie zerfiel zwar ein Großteil der lipophilen Steroidkonjugate in Steroidsulfate, was aber für den weiteren Verlauf der Untersuchung keine Bedeutung hatte.

e) Spaltung der einzelnen Steroidkonjugate:

1.) Das Verfahren der Solvolyse nach Burstein und Liebermann, (7) dem die Steroidsulfate und Steroidsulfatide unterworfen wurden, wurde für die Hydrolyse der Sulfokonjugate als ausreichend erachtet. Die Rückstände der sulfat- und sulfatidhaltigen Fraktionen wurden nach Eindampfen mit ca. 20 ml Wasser aufgenommen, mit 2 g Natriumchlorid versetzt und mit 1 ml konzentrierter Schwefelsäure angesäuert. Beide Fraktionen wurden zweimal mit je 25 ml Äthylacetat extrahiert und die Extrakte 24 Stunden bei 37° C bebrütet. Anschließend erfolgte die Waschung der Solvolysate mit 1 N Natronlauge und Wasser, die Entfettung, die Trocknung und Eindampfung im Rotavac bei 37° C.

2.) Die enzymatische Hydrolyse mit Beta-Glucuronidase erschien für die Spaltung der Steroid-Glucuronoside in der Natriumbicarbonatfraktion geeignet:

Man stellte die Lösung mit 5 M Acetatpuffer auf ein ph = 4,75 ein, und inkubierte mit 1000 E. Beta-Glucuronidase (ketodase, Warner-Chilcott, Morris Plains, N.J., USA) pro ml Lösung für 48 Stunden bei 37° C. Das Hydrolysat wurde dreimal in o. a. Weise mit Methylenchlorid extrahiert, die Extrakte anschließend mit 1 N Natronlauge und Wasser gewaschen, getrocknet und im Rotationsverdampfer bei 35° C zur Trockne gebracht.

f) Dünnschichtchromatographie der freigesetzten Corticosteroide:

Zur Abtrennung des Cortisols von seinem Metaboliten kam die Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G (Merck, Darmstadt) in den Lösungsmittelsystemen Chloroform/Äthanol (9 : 1 v/v) bzw. Benzol/Äthanol (4 : 1 v/v) zur Anwendung.

Farbreaktionen:

Mittels Testsubstanzen wurden die corticosteroidhaltigen Zonen auf den Dünnschichtchromatogrammen festgelegt. Nach Desaktivieren des Kieselgels mit Wasserdampf konnten die Corticosteroide nach Abkratzen der entsprechenden Zonen mit Methanol extrahiert werden. Die Eluate wurden zur Trockne eingedampft.

Die Farbreaktion erfolgte nach der Methode von Porter und Silber: (48)

Den Trockenrückstand löst man in 0,25 ml absoluten Alkohol, gibt 3 ml Methylenchlorid dazu und extrahiert die Porter-Silber-Chromogene mit 0,5 ml einer Lösung von 65 mg Phenylhydrazinhydrochlorid in 100 ml 62%iger Schwefelsäure. Nach 25 sec. intensiven Schüttelns wird das Gemisch 30 Min.

bei Zimmertemperatur gehalten, 6 Min. bei 1600 U/Min. zentrifugiert und der Methylenchloridüberstand abgesaugt. Dann stellt man die Proben 40 Min. in ein Wasserbad von 60° C und mißt die Extinktion im Photometer bei 405 mμ gegen 62%ige Schwefelsäure.

Bei den 17-Ketosteroiden wurde ebenfalls eine Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G (Merck, Darmstadt) durchgeführt, und zwar im Lösungsmittelsystem Chloroform/Dioxan (94 : 6 v/v).
Nach Elution der steroidhaltigen Zonen wurde die Zimmermann-Reaktion angewandt: (64)
Der Rückstand wird mit 0,2 ml 1%igem m-Dinitrobenzol in abs. Alkohol gelöst, mit 0,1 ml 2,5 N Kalilauge in 90%igem Äthanol versetzt und eine Stunde bei 25° C in der Dunkelheit bebrütet. Nach Zugabe von 0,5 ml Wasser und Extraktion mit 1 ml Äther mißt man die Extinktion bei 510 mμ.

C. Ergebnisse:

Die mit der vorliegenden Methode gewonnenen Ergebnisse sind aus Tabelle 3 zu ersehen; sie stellen den Mittelwert von je 2 Plasmapools aus je 10 Einzelversuchen dar.

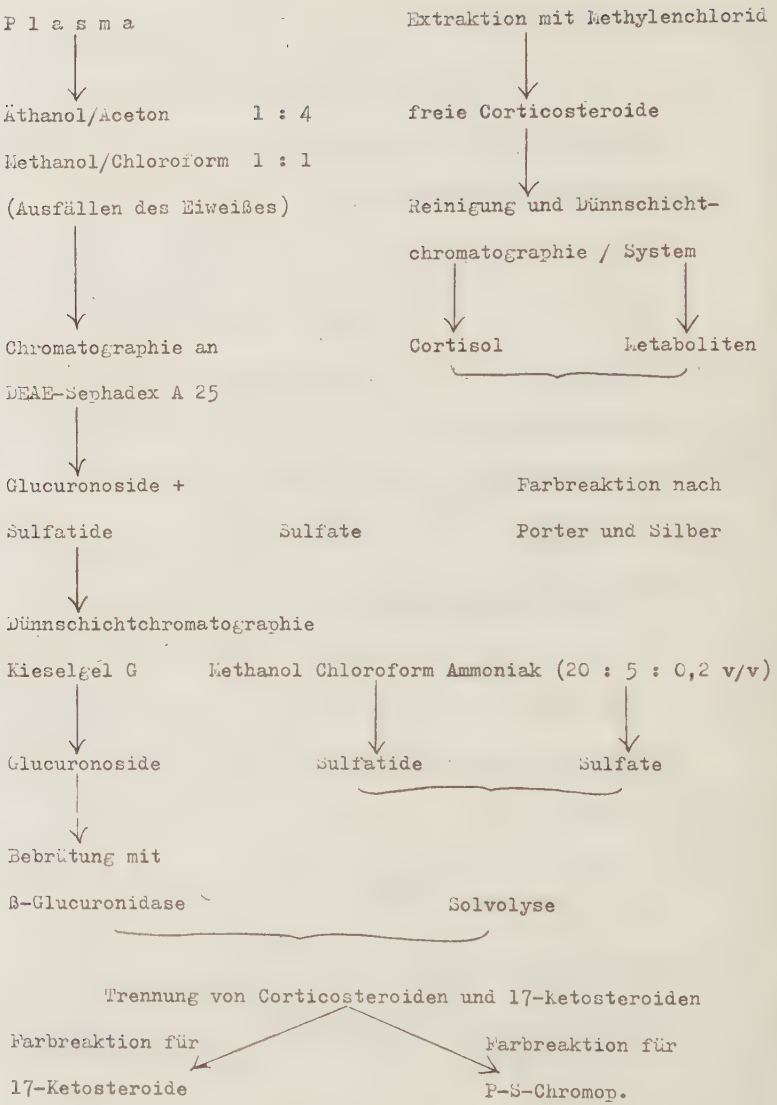

Abb. 2: Chemische Aufarbeitung des gewonnenen Plasmas.

	Nebennierenvenen-Plasma	peripheres Plasma
Corticosteroide frei	221,0	20,0
Corticosteroide konjugiert	97,3	67,7
davon:		
Cortisol-Glucuronosid	4,8	4,3
Cortisol-Sulfatid	18,9	4,0
Cortisol-Sulfat	9,0	9,5
gesamt	32,7	17,8
restliche Corticosteroid-Glucuronoside	18,8	20,9
" Corticosteroid-Sulfatide	21,1	8,9
" Corticosteroid-Sulfate	24,6	10,1
gesamt	64,6	39,9
17-Ketosteroide konjugiert	1.006,4	87,5
davon:		
17-Ketosteroide-Glucuronoside	36,4	13,1
17-Ketosteroide-Sulfatide	426,6	21,8
17-Ketosteroide-Sulfate	543,4	52,6

Tabelle 3: Freie und konjugierte Steroide im peripheren und Nebennierenvenenblut des Meerschweinchens. (n = 2 x 10)

Erwartungsgemäß lag die Konzentration im Nebennierenvenenblut höher als in der Peripherie, und zwar um einen Faktor von etwa 10 bei den freien Corticosteroiden. Die konjugierten Corticosteroide zeigten keine wesentliche Konzentrationsvermehrung im Nebennierenvenenblut.
Auffällig ist lediglich, daß das Cortisolsulfatid im adrenalen Plasma deutlich erhöht erscheint gegenüber dem peripheren Plasma. Dies trifft im gewissen Sinne - wenn auch weniger deutlich - auch für die restlichen Corticosteroidsulfatide zu. Ähnlich wie bei den Corticosteroiden ist bei den 17-Ketosteroiden die Konzentration im Nebennierenvenenblut mindestens um das 10-fache höher als im peripheren Blut.

D. Diskussion

Die Bestimmung der Harnsteroide, der Plasmasteroide im peripheren und Nebennierenvenenblut sowie ihrer biologischen Halbwertszeiten bzw. Sekretionsraten erlauben eine Übersicht über die tatsächliche Produktion an Steroiden. Für eine umfassende Betrachtung des allgemeinen Steroidhaushaltes sind allerdings noch weitere Untersuchungen erforderlich, die sich speziell mit dem Stoffwechsel einzelner Steroide oder Steroidgruppen in der Peripherie bzw. in verschiedenen Geweben beschäftigen. Sie stellen das Bindeglied zwischen Ausscheidung, Produktion und biologischer Halbwertszeit im Plasma dar.

Schon frühzeitig erkannte man, daß der Leber im Gesamtstoffwechsel der Steroide eine sehr bedeutende Rolle zukommt. Man nahm hier anfänglich an, daß sie lediglich dem Abbau zu wasserlöslicheren Metaboliten bzw. Konjugaten diene, (4, 6, 63) die letztlich erst eine Ausscheidung auf renalem Weg ermöglichen. Es ist sicherlich eine Hauptaufgabe der Leber im Steroidmetabolismus, doch laufen im Lebergewebe auch Prozesse ab, in deren Verlauf weitere biologisch aktive Steroide gebildet werden. So zeigte eine Reihe von Versuchen, daß die Leber eine vorzügliche Bildungsstätte der sog. Steroidsulfatide darstellt. (37) Diese sog. Steroidsulfatide, insbesondere aus der Androgenreihe, die bereits eingangs erwähnt wurden, stellen offenbar Sulfokonjugate dar, bei denen die zweite OH-Gruppe der Schwefelsäure mit einem Diglyceridrest verestert ist. Steroidsulfatide unterscheiden sich wesentlich von den Steroidsulfaten, wie dies auch aus den in der Einleitung wiedergegebenen Untersuchungen über die biologische Halbwertszeit von Steroiden im Plasma hervorgeht.
Die Tatsache, daß in der Leber aus Steroidsulfaten in großem Maße Steroidsulfatide gebildet werden, kann man sich auch bei der biosynthetischen Herstellung dieser Sulfatide zunutze machen. (61) So gelang es nach Inkubation von Steroidsulfaten mit Lebermitochondrien große Mengen von Steroidsulfatiden zu isolieren.
Im weiteren Verlauf der Leberperfusionsversuche beim Meerschweinchen mit Dehydroepiandrosteron und seinen Konjugaten, (57, 61) bzw. auch mit Cortisol, zeigte sich, daß ein beträchtlicher Teil der in die Leber (56)

gelangenden Steroide mit der Galle ausgeschieden wird. (32, 28) Dagegen ist über die Ausscheidung von adrenalen Steroiden mit den Faeces bisher nichts bekannt.

In weiteren Versuchen (26, 27, 29, 30) konnte auch festgestellt werden, daß im Dünndarm eine Resorption der mit der Galle sezernierten Steroide stattfindet. Da das intestinale Blut wiederum der Leber zugeführt wird, liegt hier ein enterohepatischer Kreislauf vor. Während der einzelnen Schritte dieses enterohepatischen Kreislaufes werden offenbar je nach sezernierter Konjugationsform weitere metabolische Schritte, bzw. Re- und Umkonjugationen vorgenommen.

Auf Grund dieser Untersuchungen beim Meerschweinchen wurden analoge Versuche beim Menschen durchgeführt, bei denen ebenfalls ein enterohepatischer Kreislauf adrenaler Steroide nachzuweisen war. Auf Grund dieses enterohepatischen Kreislaufes steht dem Organismus ein größerer Pool an Steroiden zur Verfügung, mit dessen Hilfe die Leber Schwankungen im Bereich der Plasmakonzentrationen, die einerseits durch Produktion, bzw. Sekretion seitens der Nebennierenrinde, andererseits aber auch durch Änderung der renalen Clearance hervorgerufen wurde, z. T. ausgleichen kann. Zu einem gewissen Teil dürften hierbei nicht nur das eigentliche Leberparenchym, sondern auch die Kupfer'schen Sternzellen an den Problemen der Konjugation beteiligt sein.

Wie in einer Reihe von Versuchen gezeigt werden konnte, kommt dem sog. reticuloendothelialen System eine große Bedeutung bei der Konjugation und dem Metabolismus des Cortisols beim Meerschweinchen zu. (10, 11, 21, 22, 23, 24, 52)

Eine Aktivitätssteigerung des reticuloendothelialen Systems ist mit einer vermehrten Konjugation von Cortisol verknüpft. Dies läßt sich durch Experimente beim splenektomierten Meerschweinchen nachweisen, außerdem nach Stimulation des reticuloendothelialen Systems mittels pyrogener Reizstoffe und auch mittels Gewebsextrakten aus Milz und Blut, die durch ihren hohen Gehalt an metabolisch noch aktiven Stoffwechselprodukten des reticuloendothelialen Systems dieses wiederum anzuregen vermögen.

Aber auch das Blut selbst besitzt eine gewisse, nicht zu vernachlässigende metabolische Aktivität gegenüber adrenalen Steroiden. So gelang es beim Meerschweinchen und später auch beim Menschen, eine Umwandlung von freiem Dehydroepiandrosteron bzw. Dehydroepiandrosteronsulfat in lipophile Dehydroepiandrosteronkonjugate im Blut nachzuweisen.

Die Niere ist gleichfalls von Wichtigkeit im Steroidhaushalt; einerseits ist bekannt, daß sie als Ausscheidungsorgan für wasserlösliche Metaboliten bzw. Konjugate fungiert, (17, 62, 43, 25, 5) zum anderen beobachtete man bei der kurzzeitigen Nierenperfusion am Meerschweinchen, (2, 55) daß wesentlich mehr Steroide vom Nierenparenchym aufgenommen als später tatsächlich im Urin ausgeschieden werden. Ein großer Teil der über die Arterie zugeführten Steroide wird gleichzeitig metabolisiert und an das Nierenvenenblut abgegeben.

Daß auch die Gonaden am Stoffwechselgeschehen der Steroidhormone beteiligt sind, - (19, 8, 14) beim weiblichen Tier im schwangeren Zustand zusätzlich die Placenta, - steht fest. Auf derartige Probleme soll aber in diesem Zusammenhang nicht weiter eingegangen werden.

Aus den bisher zitierten Literaturstellen läßt sich ersehen, daß peripheres Gewebe und die Leber durchaus in der Lage sind, in den Steroidmetabolismus einzugreifen und eine Regulation zwecks Erhaltung biologisch aktiver Steroide ermöglichen. Das bedeutendste Organ für den Nachschub an biologisch aktiven Steroidhormonen ist zweifelsohne die Nebennierenrinde, wie bei den hier beschriebenen Experimenten an Hand deutlich erhöhter Steroidkonzentrationen im Nebennierenvenenblut nachweisbar. Solches gilt für die Steroide, deren hohe biologische Aktivität bekannt ist, wie etwa Cortisol oder in gewissem Maße auch Dehydroepiandrosteron. Letzteres C_{19}-Steroid nimmt eine hervorragende Stellung in der Biogenese der Androgene und Östrogene ein.
Die hohen Konzentrationen an Steroidsulfatid, die ebenfalls für eine Sekretion seitens der Nebennierenrinde sprechen, unterstreichen deren biologische Bedeutung. Auch bei diesem Versuch lassen sich Parallelen zum Steroidhaushalt des Menschen ziehen. Die Konzentrationsunterschiede der hauptsächlich aus der Nebennierenrinde sezernierten Steroide liegen in der gleichen Größenordnung. Zur Vervollständigung des Bildes muß an dieser Stelle noch auf die Regulationsmechanismen, die die Sekretion adrenaler Steroide beeinflussen, eingegangen werden: An erster Stelle wäre hier das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) zu nennen, das vor allen Dingen die Seitenkettenabspaltung des Cholesterins begünstigt, wodurch der eigentliche Precursor sämtlicher adrenaler Steroide, das Pregnenolon, entsteht. (16, 58) Der Erfolg einer erhöhten ACTH-Sekretion ist eine vermehrte Bildung von Cortisol. Beim Menschen ist weiterhin bekannt, daß unter ACTH auch die Steroide der androgenen Reihe vermehrt gebildet

werden. Dies ließ sich beim Meerschweinchen nicht in gleichem Maße nachweisen. Dagegen liegt die Annahme nahe, daß gonadotrope Substanzen die Produktion adrenaler Androgene beim Meerschweinchen stimulieren. (3, 12) Solches konnte an Hand von Versuchen an kastrierten männlichen Meerschweinchen dargelegt werden. Inwieweit hier Konjugationsprobleme bzw. die Möglichkeit einer direkten Umwandlung von Cholesterin bzw. Cholesterinsulfat eine Rolle spielen, kann an dieser Stelle nicht entschieden werden. Sicherlich nehmen noch andere Mechanismen wie z. B. die Wechselbeziehungen von Steroidhormonen untereinander einen Einfluß auf die adrenale Sekretion. Solche Funktionen bleiben gleichfalls weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der Steroidhaushalt des Meerschweinchens dem des Menschen in gewisser Hinsicht vergleichbar ist. Es gilt dies insbesondere für die Corticosteroide, wie hier an Hand der freien und konjugierten 17-Hydroxy-Corticosteroide bzw. des Cortisols dargelegt. Auf Grund der Tatsache, daß das Verhältnis vom Körpergewicht zu Nebennierenrindengewicht beim Meerschweinchen im Verhältnis zum Menschen zugunsten der Nebennierenrinde verschoben ist, eignet sich das Meerschweinchen in besonderem Maße für Untersuchungen über Sekretion und Stoffwechsel von Steroidhormonen.

E. Z U S A M M E N F A S S U N G

Es wird über den Steroidhaushalt des Meerschweinchens berichtet und zwar über die Ausscheidung im Urin, über Plasmawerte und biologische Halbwertszeit.
Im experimentellen Teil werden Versuche und Ergebnisse mit Nebennierenvenenblut des Meerschweinchens dargestellt.
Die Gesamtergebnisse werden im Zusammenhang mit der übergeordneten hormonalen Regulation diskutiert.

F. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

(1) Apostolakis, M.
Voigt, K.D.
Gonadotropine
G. Thieme Verlag Stuttgart (1960)

(2) Bleier, A.J. jr.
Morgen, R.O.
Venning, E.H.
Beck, J.C.
Steroids 2, 337, (1963)

(3) Bühner, P.
Kindt, W.
Certel, G.W.
Endokrinologie 51, 303 (1967)

(4) Burstein, S.
J. Americ. Chem. Soc. 78, 1769 (1956)

(5) Burstein, S.
Dorfman, R.I.
J. biol. Chem. 238, 1656 (1963)

(6) Burstein, S.
Kimball, H.L.
Bhavnani, B.R.
Steroids 2, 195 (1963)

(7) Burstein, S.
Liebermann, S.
J. biol. Chem. 233, 33 (1959)

(8) Burstein, S.
Ungar, F.
Gut, M.
Dorfman, R.I.
Endokrinologie 56, 267 (1955)

(9) Creutzfeld, W.
Husten, L.
Haager, K.
Path. Anatomie, 113, 426 (1953)

(10) Dieterich, P.
Kindt, W.
Kaiser, E.
Acta hepato - splenologica 12, 293 (1965)

(11) Dieterich, P. — Endokrinologie 50, 251, (1966)
Kindt, W.
Kaiser, E.

(12) Ebersohl, C. — Endokrinologie 52, 63, (1967)
Kindt, W.
Certel, G.W.

(13) Finkelstein, J.W. — Steroids 6, 435, (1966)

(14) Goebelsmann, U. — Steroids 6, 659, (1965)
Diczfahrsy, E.
Katz, J.
Levitz, M.

(15) Heap, R.B. — J. Reprod. Fert. 13, 537 - 556, (1967)
Perry, J.S.
Rowlands, I.W.

(16) Lechter, O. — Recent. Progr. Horm. Res. 6, 215 (1951)
Zaffaroni, A.
Jakobsen, K.P.
Jeanloz, R.
Levy, M.
Schenker, V.
Pineus, G.

(17) Mein, H. — Arzneim. - Forsch. 6, 6, (1956)
Certel, G.W.

(18) Jung, E. — VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (1956)

(19) Jungter, L. — Berlin (1950)

(20) Kaiser, E. — Z. Klin. Chem. 1, 25, (1963)
Certel, G.W.

(21) Kaiser, E. — Acta hepato - splenologica 11, 321 (1964)
Kindt, W.
Zimmermann, W.

(22) Kaiser, E.
Rindt, W.
Klin. W. schr. 42, 646, (1964)

(23) Kaiser, E.
Rindt, W.
Endokrinologie 49, 69, (1965)

(24) Kaiser, E.
Rindt, W.
Dtsch. med. Forschg. 2, 163, (1964)

(25) Kment, A.
Wietek, J.F.
Arzneim. - Forschg. 7, 564, (1957)

(26) Knapstein, P.
Oertel, G.W.
Experientia 22, 577, (1966)

(27) Knapstein, P.
Oertel, F...
Z. physiol. Chem. 346, 161, (1966)

(28) Knapstein, P.
Rindt, ..
Oertel, G.W.
12. Symp. Dtsch. Endokrinologie
Wiesbaden 1966

(29) Knapstein, P.
Rindt, ..
Oertel, G.W.
Z. physiol. Chem. 346, 192, (1966)

(30) Knapstein, P.
Rindt, W.
Treiber, L.
Oertel, G.W.
Z. physiol. Chem. 346, 192, (1966)

(31) Lübke, P.
Rindt, W.
Zimmermann, W.
Z. kl. Bakt. 1 Orig. 204, 417, (1967)

(32) Meiser, J.
Rindt, W.
Knapstein, P.
Oertel, G.W.
Europ. J. Steroids 1, 15, (1966)

(33) Norymberski, I.K. Lancet 1, 1276, (1953)
Stubks, A.D.
West, H.F.

(34) Oertel, G.W. Radio-Isotope i. d. Endokrinologie Freiburg 1963

(35) Oertel, G.W. Biochem. Z. 339, 125, (1963)

(36) Oertel, G.W. Biochem. Z. 339, 135, (1963)

(37) Oertel, G.W. 10. Symp. Dtsch. Endokrinologie 249, (1963)

(38) Oertel, G.W. Arztl. Lab. 10, 176, (1964)

(39) Oertel, G.W. Z. physiol. Chem. 336, 236, (1964)

(40) Oertel, G.W. Z. physiol. Chem. 336, 236, (1964)

(41) Oertel, G.W. Z. physiol. Chem. 341, 1 (1965)
Groot, K.

(42) Oertel, G.W. Acta endokrin. 49, 533, (1965)
Groot, K.
Menzel, D.

(43) Oertel, G.W. Z. physiol. Chem. 301, Bd. (1955)
Hein, H.

(44) Oertel, G.W. Biochem. Z. 336, 10, (1962)
Kaiser, E.

(45) Oertel, G.W. chem. Acta 7, 221, (1962)
Kaiser, E.

(46) Oertel, G.W. J. Chromatog. 14, 509 - 511, (1964)
Tornero, M.C.
Groot, K.

(47) Oertel, G.W. Z. Physiol. Chem. 342, 61, (1965)
Kurie, A.

(48) Porter, C.C.
Silber, R.H.
J. biol. Chem. 185, 201, (1950)

(49) Rindt, W.
Inaug. Diss. (1965)

(50) Rindt, W.
Pers. Mitteilung.

(51) Rindt, W.
Braunberger, G.
Kaiser, E.
Oertel, G.W.
in Vorbereitung.

(52) Rindt, W.
Kaiser, E.
Zimmermann, W.
Acta hepato - splenologica

(53) Rindt, W.
Kaiser, E.
Zimmermann, W.
Endokrinologie 47, 3, (1964)

(54) Rindt, W.
Oertel, G.W.
13. Symp. Dtsch. Endokrinologie
Würzburg 1967

(55) Rindt, W.
Oertel, G.W.
Acta endokrin. 55, 656, (1967)

(56) Rindt, W.
Oertel, G.W.
Endokrinologie 53, 118, (1968)

(57) Rindt, W.
Weinand, K.
Oertel, G.W.
12. Symp. Dtsch. Endokrinologie
Wiesbaden 1966

(58) Siere, P.A.
Chaikoff, I.L.
Dauben, W.G.
J. biol. Chem. 176, 626, (1948)

(59) Weinand, K.
Rindt, W.
Oertel, G.W.
Acta endokrin. 51, 210, (1966)

(60) Weinand, K.
Rindt, W.
Oertel, G.W.
Acta endokrin. 52, 319, (1966)

(61) Weinand, K.
Rindt, W.
Oertel, G.W.
Endokrinologie 50, 145, (1966)

(62) Winkler, G.
Blobel, R.
Herrmann, K.
Tonutti, E.
Endokrinologie 45, 112, (1963)

(63) Wyngaarden, J.B.
Peterson, R.E.
Wolff, A.R.
J. biol. Chem. 212, 963, (1955)

(64) Zimmermann, W.
Anton, H.V.
Pontius, D.
Z. physiol. Chem. 289, 91, (1952)

Lebenslauf

Am 10. Mai 1939 wurde ich in Homburg/ Saar geboren.
Meine Eltern sind: August Braunberger, leitender Angestellter einer Sparkasse und Scholastika Braunberger, geborene Beck.

Die Volksschule besuchte ich in Friedrichroda/ Thüringen und Homburg/ Saar, später das Realgymnasium Homburg/ Saar, an dem ich im März 1958 das Abitur bestand.

Ich begann das Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes im Sommersemester 1958.
Nach der ärztlichen Vorprüfung und dem Physikum wechselte ich zwei Semester an die Universität Würzburg. Anschließend führte ich das Studium an der Universität des Saarlandes fort und legte dort im Juli 1964 das Staatsexamen ab.

Die Medizinalassistentenzeit verbrachte ich am Kreiskrankenhaus Stolzenau/ Weser; nach der Approbation (1966) leistete ich meine 12-monatige Wehrpflicht bei dem Sla Rak Btl. 37 in Aurich/ Ostfriesland ab.
Nach Beendigung der Dienstzeit kehrte ich an das Kreiskrankenhaus Stolzenau zurück.
Seit 1. 1. 1969 bin ich Assistent der Inneren Abteilung am Kreiskrankenhaus Hameln/ Weser.

Danksagung

Für den Arbeitsplatz am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität des Saarlandes in Homburg, den mir Herr Professor Dr. med., Dr. phil., Dipl.-Chem. W. Zimmermann zur Verfügung gestellt hat, möchte ich mich herzlich bedanken.

Herrn Professor Dr. rer. nat. G.W. Oertel danke ich für die Überlassung des Themas, sowie für die freundliche Anleitung.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. W. Rindt für seine hilfreichen Ratschläge bei der Durchführung der Versuche.